

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	龍田 典子
題 目	生化学的・分子生物学的蛍光染色法による土壌細菌の解析法の開発および 動態解析  (Development of biochemical and molecular biological fluorescent staining techniques for quantifying soil bacteria and the application to population dynamics study)

本研究では、土壌中に生存する細菌を蛍光染色により定量する手法のうち、生菌数の定量法および脱窒菌の定量法を確立し、水田土壌中のこれら細菌の動態解析に適用した。

1. 生細菌測定法として、呼吸活性を持つ細菌を定量する 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) 法に着目し、その改良法として CTC-SG 法の土壌試料への適用を検討した。グラム陰性菌 2 種およびグラム陽性菌 3 種の新鮮培養細胞を CTC-SG 法に供試した結果、良好な染色性（全細胞の 62～95%）が認められた。また、飢餓培養により難培養となった細胞も検出可能であった。水田や畑土壌中の CTC-SG 法による呼吸活性陽性細菌数は全菌数の 10～12% であり、培養可能な細菌数の 1.5～5.2 倍であった。これらの結果から、土壌中で呼吸活性を有する生細菌の定量に適用できることが実証された。
2. 土壌中の脱窒菌の定量法として、*direct in situ* PCR 法を開発した。純粋培養菌を本法に供試した結果、陽性対照菌では 97.6～100% の検出率であったのに対し、陰性対照菌では不検出ないし 2.4% であり、特異性が極めて高いことが示された。畑および水田土壌中の脱窒菌数を測定した結果、本法では  $2.7 \times 10^8$ ～ $2.5 \times 10^9$  cells g<sup>-1</sup> 乾土という高い値が得られ、従来法である MPN 法ではそれらの  $1/10^6$ ～ $1/10^3$  であった。これらの結果から、MPN 法では脱窒菌数を著しく過小評価しており、本法を用いることで、より正確に脱窒菌を定量することが可能となった。
3. 水田土壌中の細菌の動態解析のため、各種の定量法を用いて細菌数の変動を年間調査した。その結果、蛍光染色法による全細菌数には大きな変動は認められなかった。CTC-SG 法により、土壌中の約 10% の細菌が酸素呼吸活性を有していることが判明し、これは培養法の数倍の菌数であった。脱窒菌数は培養法で  $10^4$ ～ $10^6$  個 g<sup>-1</sup> 乾土であったが *direct in situ* PCR 法で得られた菌数は  $10^8$ ～ $10^9$  cells g<sup>-1</sup> 乾土で、全菌数の 4～20% に相当した。さらに、硝酸呼吸菌（脱窒菌）が酸素呼吸菌よりも多く、水田土壌での主要な呼吸様式をとる優占群であることを、初めて明らかにした。

以上のように、水田土壌中の細菌の動態を培養法によらない方法を用いて定量的に年間解析した。このような研究は本研究が初めてである。特に脱窒菌が水田土壌の細菌群集の中で、従来考えられていたよりも菌数の上で主要な菌群の一つであることが検証された。本研究で開発した *direct in situ* PCR 法はプライマーを変えることで脱窒菌以外の多種多様な機能を持つ細菌群にも原理的に応用が可能であり、土壌の物質循環を理解するうえで重要な機能を有する細菌群の動態解明に今後大きく寄与すると考えられる。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Noriko Ryuda
題 目	Development of biochemical and molecular biological fluorescent staining techniques for quantifying soil bacteria and the application to population dynamics study (生化学的・分子生物学的蛍光染色法による土壌細菌の解析法の開発および動態解析)
<p>Culture-independent fluorescent staining techniques for quantifying respiratory-active and denitrifying bacteria in soil were developed and applied for the field survey in paddy soil to reveal seasonal changes in the number of various bacteria including these bacteria in combination with other various direct count and plate count methods.</p> <p>1. A 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) -SYBR Green I double-staining (CTC-SG) method was developed to enumerate respiratory-active bacteria in soil. By the CTC-SG method, almost all cells in the late logarithmic growth phase of several Gram-positive and -negative facultative anaerobic bacteria were detected as respiratory positive, suggesting the validity of the method. A starved culture of <i>E. coli</i> showed the presence of viable but nonculturable cells, as detected by the CTC-SG method after two weeks of incubation. The counts of metabolically active bacteria in upland and paddy soils by the CTC-SG method were <math>4.5 \times 10^8</math>-<math>1.4 \times 10^9</math> cells <math>g^{-1}</math> dry soil, which were as much as 10-12% of the total bacterial count and 1.5-5.2 times higher than the plate counts.</p> <p>2. A single-cell identification technique that is culture-independent, direct <i>in situ</i> PCR, to enumerate denitrifying bacteria in soils was developed. The specificity of this method was evaluated with six species of denitrifying bacteria using <i>nirK</i> as the target gene; <i>Escherichia coli</i> was used as a negative control. Almost all (97.3%–100%) cells of the <i>nirK</i>-type five species of denitrifying bacteria were detected by this method, whereas no <i>E. coli</i> cells and only a few cells (2.4%) of <i>nirS</i>-type denitrifying bacteria were detected. Numbers of denitrifying bacteria in upland and paddy soil samples quantified by this method were <math>3.3 \times 10^8</math> to <math>2.6 \times 10^9</math> cells <math>g^{-1}</math> dry soil. These values are approximately 1,000 to 300,000 times higher than those estimated by the conventional MPN method. These results suggest that the direct <i>in situ</i> PCR is a better tool for quantifying denitrifying bacteria in soil than the MPN method.</p> <p>3. Seasonal changes in the numbers of bacteria in a paddy field soil were surveyed by using several culture-independent and -dependent methods throughout of a year. Number of total bacteria determined by ethidium bromide direct counting was at a level of <math>10^{10}</math> cells <math>g^{-1}</math> dry soil and showed a little change throughout a year. A similar pattern was obtained for the number of total viable count by CFDA direct counting. In contrast, counts of culturable bacteria were at a level of <math>10^7</math>-<math>10^8</math> and fluctuated to the great extent. The counts of denitrifying bacteria by direct <i>in situ</i> PCR were as same as 4 - 20% of total bacteria. Number of respiratory-positive bacteria was several times lower than that of denitrifying bacteria.</p> <p>These results suggest that denitrifying bacteria would appear to comprise a larger functional group within the soil bacterial community than previously thought and that the methods developed in this study would be promising tools to quantify respiratory-active and denitrifying bacterial populations for their ecological studies in the soil.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	リュウダ ノリコ 龍田 典子
審査委員	主査 佐 賀 大学 教授 井上 興一
	副査 佐 賀 大学 准教授 染谷 孝
	副査 鹿児島 大学 教授 境 雅夫
	副査 佐 賀 大学 准教授 北垣 浩志
	副査 鹿児島 大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
題 目	生化学的・分子生物学的蛍光染色法による土壌細菌の解析法の開発及び動態解析 (Development of biochemical and molecular biological fluorescent staining techniques for quantifying soil bacteria and the application to population dynamics study)
<p>本研究では、土壌中に生存する細菌のうち、酸素呼吸菌および硝酸呼吸菌（脱窒菌）の蛍光染色による定量法を確立し、水田土壌中のこれら細菌群の動態解析を行った。</p> <p>1. 酸素呼吸活性を持つ細菌をチトクローム系との共役反応により定量する方法である 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)法に着目し、その改良法として CTC-SYBR Green I (SG) 法の土壌試料への適用を検討した。グラム陰性菌 2 種およびグラム陽性菌 3 種の新鮮培養細胞を CTC-SG 法に供試した結果、良好な染色性(全細胞の 62~95%)が認められた。また、飢餓培養により難培養となった細胞も検出可能であった。水田や畑土壌中の CTC-SG 法による呼吸活性陽性細菌数は全菌数の 10~12%であり、培養可能な細菌数の 1.5~5.2 倍であった。これらの結果から、土壌中で呼吸活性を有する生細菌の定量に適用できることが実証された。</p> <p>2. 土壌中の脱窒菌の定量法として、<i>direct in situ</i> PCR 法を開発した。純粋培養菌を本法に供試した結果、陽性対照菌では 98~100%の検出率であったのに対し、陰性対照菌</p>	

では不検出ないし 2.4%であり、特異性が極めて高いことが示された。畑および水田土壌中の脱窒菌数を測定した結果、本法では  $2.7 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^9$  cells  $g^{-1}$  乾土という高い値が得られ、従来法である MPN 法ではそれらの  $1/10^6 \sim 1/10^3$  という低率であった。これらの結果から、MPN 法では脱窒菌数を著しく過小評価しており、本法を用いることで、極めて正確に脱窒菌を定量することが可能となった。

3. 水田土壌中の細菌の動態解析のため、上記新規手法を含む各種の定量法を用いて細菌数の変動を通年調査した。その結果、蛍光染色法による全細菌数および全生菌数には大きな変動は認められなかった。CTC-SG 法により、土壌中の約 10%の細菌が酸素呼吸活性を有していることが判明し、これは培養法の数倍の菌数であった。脱窒菌数は培養法で  $10^4 \sim 10^6$  MPN  $g^{-1}$  乾土であったが、*direct in situ* PCR 法で得られた菌数は  $10^8 \sim 10^9$  cells  $g^{-1}$  乾土で、全菌数の 4~20%に相当した。さらに、硝酸呼吸を行う脱窒菌が酸素呼吸菌よりも多く、水田土壌での主要な呼吸様式をとる優占群であることを、初めて明らかにした。

このように、水田土壌中の細菌の動態を培養法によらない方法を用いて定量的に通年解析した研究は本研究が初めてである。特に脱窒菌については、脱窒活性という機能としてはよく知られていたが、水田土壌の細菌群集の中で、菌数は極めて低いものと考えられていた。しかし、本研究から菌数の上でも主要な菌群の一つであることが解明された。本研究で開発した *direct in situ* PCR 法はプライマーを変えることで脱窒菌以外の多種多様な機能を持つ細菌群にも原理的に応用が可能であり、土壌の物質循環を理解するうえで重要な機能を有する細菌群の動態解明に今後大きく寄与すると期待される。

以上のように本論文は、非培養法による土壌細菌の新たな定量法の導入に成功しており、それらを用いて水田土壌の主要な細菌群の動態を明らかにした初めての論文である。土壌微生物学及び農業の基盤研究として価値が高く、学位論文として十分価値のあるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	リュウダ ノリコ 龍田 典子
審査委員	主査 佐賀大学 教授 井上 興一
	副査 佐賀大学 准教授 染谷 孝
	副査 鹿児島大学 教授 境 雅夫
	副査 佐賀大学 准教授 北垣 浩志
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
実施年月日	平成23年1月25日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査の5名は、平成23年1月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	リュウダ ノリコ 龍田 典子
<p>[質問1] 生きてはいるが培養できない細菌が土壌中の細菌の約99%を占めるというのは、栄養不足などのためか？</p> <p>[回答1] いくつかの理由が考えられる。ひとつは細胞の損傷。また多くの場合、活性はあるが肉眼的なサイズのコロニーを作らず、マイクロコロニーを形成して増殖が停止するというもの。死にゆく過程にある細胞も考えられる。</p> <p>[質問2] 培養液組成が合わないという可能性は？</p> <p>[回答2] 培地の組成について、従来多くの研究者が様々な試みを重ねてきたが、それでも難培養の問題は解決できていない。通常の栄養培地を百倍程度希釈した培地に土壌を接種すると、全細菌の4、5割が24時間以内にマイクロコロニーまで増殖する。従って栄養は足りていると考えられる。</p> <p>[質問3] 水田土壌の細菌遷移の概念図で、同一の細菌が呼吸様式を変えるのか、それとも種類が変わるのか？</p> <p>[回答3] 脱窒菌は多種多様な細菌種にまたがり、酸素呼吸能も有することが多数の分離株で確かめられている。従って、群集構造が変わるというよりも、同一菌群が呼吸様式を変えているものと考えられる。これは現時点では仮説だが、機能と群集構造を同時に解析できる手法を今後適用することで明らかにできると考えられる。</p> <p>[質問4] 本研究の農業現場への応用の可能性は？</p> <p>[回答4] 脱窒菌は亜酸化窒素の発生者として約60%の寄与をしていると言われていたので、窒素動態を制御するような手法に本研究の成果を応用することが考えられる。また、確立した<i>direct in situ</i> PCR法は、プライマーを変えることにより、土壌中の植物病原菌など多くの機能群の特異的検出に応用できると考えられる。</p> <p>[質問5] CTC-SG法で、基質を糖ではなく酵母エキスにした理由は？</p> <p>[回答5] 種々の基質を検討した結果、酵母エキスが最も良いとの結論を得ている。</p> <p>[質問6] CTC-SG法よりもCFDA法で菌数が高いのは、嫌気性菌が含まれるためか？</p> <p>[回答6] その可能性もあるが、なによりCFDA法では酵素反応と膜機能で活性を見ているのに対し、CTC-SG法ではチトクローム系、すなわちエネルギー代謝系が動いていることを見ており、それだけ、より活性の高い状態を検出しているものと考えられる。</p> <p>[質問7] アエロモナスがCFDAで染まらない理由は？</p>	

[回答7] CFDAの細胞内への取り込みが、外膜などが発達しているためにできないと考えられる。

[質問8] CTC-SG法は代謝活性、脱窒菌は遺伝子で見ているので、同列に論議できないのでは？

[回答8] *direct in situ* PCR法で検出した脱窒菌には死菌体も含まれているため、両者を厳密に比較するには、生きている脱窒菌を検出する方法を開発する必要がある。いくつか原理は考えられるが、今後の課題である。

[質問9] 飢餓培養試験では、難培養化がよく出ているということか？

[回答9] 培養法による大腸菌数が顕著に減少し、CTC-SG法と大きな差が出ていることから、難培養化が進んだと考えられる。

[質問10] 水田の落水期でも硝酸呼吸菌が多く酸素呼吸菌が少ないのは、なぜか？酸化還元電位はどうか？

[回答10] 酸化還元電位を測定していないのが残念だが、落水期でもメタン生成菌などの嫌気性菌が湛水期同様に菌数を維持しているという報告もあり、落水期イコール好氣的とは単純にいかないと考えられる。

[質問11] 新しい手法を土壤に導入している。今後研究者として独立するにあたり、危険率など統計処理をこまめに行うことを勧める。報告された定量PCRのデータと開発した方法のデータを論じているが、比較できるのか？

[回答11] 本来、同じ土壤試料で比較すべきものだが、それは次の課題として、現状では大まかな傾向を比較した。

[質問12] 畑土壤と水田の脱窒菌数は、水田のほうが本来高いと考えられるが、リアルタイムPCR法ではむしろ低い傾向がある理由は？

[回答12] リアルタイムPCR法などでは土壤からのDNAの抽出効率に問題があるのではと考えられる。水田と畑で抽出効率が異なる可能性がある。